

ラットロンボキサン合成酵素遺伝子のPeroxisome Proliferator-Activated Receptor による転写抑制のメカニズム

著者	池田 勸夫
号	1864
発行年	2002
URL	http://hdl.handle.net/10097/22307

氏 名（本籍）	いけ 池	だ 田	ゆき 勸	お 夫
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 1 8 6 4 号			
学位授与年月日	平 成 14 年 3 月 25 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻			
学 位 論 文 題 目	<p>Suppression of Rat Thromboxane Synthase Gene Transcription by Peroxisome Proliferator- activated Receptor γ in Macrophages via an Interaction with NRF2</p> <p>（ラットロンボキササン合成酵素遺伝子のPer- oxiosme Proliferator-Activated Receptor γ に よる転写抑制のメカニズム）</p>			
	(主 査)			
論 文 審 査 委 員	教授 伊 藤 貞 嘉	教授 岡 本	宏	
	教授 佐 藤 靖 史			

論文内容要旨

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) は核内受容体ファミリーのひとつで、脂肪細胞分化に重要な役割を果たしている転写因子である。近年インスリン抵抗性改善薬として臨床効果の認められているチアゾリジン誘導体がそのリガンドであることが明らかとなり、糖尿病やインスリン抵抗性との関係が注目されている。一方血管平滑筋細胞や成熟マクロファージ細胞においては、炎症性メディエーターの遺伝子発現を抑制し抗炎症に働いているという報告がいくつかなされ動脈硬化における PPAR γ の生理的機能も注目されてきている。今回我々は動脈硬化や腎障害等の炎症病態の形成に深く関わっていることが知られている Thromboxane A₂ に着目し、その産生における律速酵素である Thromboxane synthase (TXS) の PPAR γ による遺伝子発現調節を解析した。ラット培養マクロファージ細胞 (NR 8383) を PPAR γ のリガンドである 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂ (PGJ₂) (1~5 μ M) やトログリタゾン (TRO) (1~20 μ M) で刺激すると TXS mRNA 発現量は濃度依存性に減少した。さらにラット TXS 遺伝子のプロモーター領域 (約 1.6 kb) を組み込んだルシフェラーゼ発現ベクター (-1598 Luc) をマクロファージ細胞にトランスフェクションし、PGJ₂ や TRO で処理すると転写活性も濃度依存性に抑制された。次に deletion analysis を行い PPAR γ の反応領域は -168 から -96 の近傍に存在すること、及び同領域にはマクロファージ細胞における -1598 Luc の major promoter を規定する領域も存在することが明らかとなった。そこで mutation analysis 及びゲルシフトアッセイを行い、まず major promoter を規定するエレメントは NF-E2/AP-1 site であり、そこに相互作用する転写因子のひとつは NF-E2 related factor 2 (NRF2) であることを明らかにした。さらにゲルシフトアッセイにおいて PGJ₂ や TRO で処理したマクロファージ細胞の核蛋白を用いた場合や、in vitro で作成した PPAR γ を反応液に添加した場合に、NRF2 を含む蛋白-DNA 複合体の結合活性が低下することを見出した。NF-E2/AP-1 site をチミンキナーゼプロモーターの上流に組み込んだベクターを作成し、マクロファージ細胞に NRF2 発現ベクターと共にトランスフェクションすると有意な転写活性の増強がみられ、この転写活性は PPAR γ の強発現によって抑制され、さらに PGJ₂ や TRO で刺激することによって相乗的に抑制された。GST プルダウンアッセイからは NRF2 が PPAR γ と直接蛋白-蛋白相互作用し、リガンド依存性にその作用が増強することが明らかとなった。以上のことから、(1) マクロファージ細胞における TXS 遺伝子の major promoter は NF-E2/AP-1 site が規定しており、ここに相互作用する転写因子のひとつは NRF2 であることが明らかとなった。(2) 活性化された PPAR γ は蛋白-蛋白相互作用を介して NRF2 の DNA への結合を抑制することで TXS 遺伝子プロモ-

ターの転写活性を抑制していることが明らかとなった。PPAR γ はマクロファージ細胞における TXS 遺伝子の発現を転写レベルで抑制することにより、動脈硬化等の炎症病態において防御的に働いている可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) は核内受容体ファミリーのひとつで、脂肪細胞分化に重要な役割を果たしている転写因子である。近年、インスリン抵抗性改善薬として臨床効果の認められているチアゾリジン誘導体がそのリガンドであることが明らかとなり、糖尿病やインスリン抵抗性との関係が注目されている。一方、血管平滑筋細胞や成熟マクロファージ細胞においては、炎症性メディエーターの遺伝子発現を抑制し、抗炎症に働いているという報告がいくつかなされ、動脈硬化における PPAR γ の生理的機能も注目されてきている。本研究は、動脈硬化や腎障害等の炎症病態の形成に深く関わっていることが知られている Thromboxane A₂ の産生における限速酵素である Thromboxane synthase (TXS) の PPAR γ による遺伝子発現調節を解析した。

〈結果〉ラット培養マクロファージ細胞 (NR 8383) を PPAR γ のリガンドで刺激すると、TXS mRNA 発現量は濃度依存性に減少した。deletion analysis, mutation analysis, ゲルシフトアッセイ、及び GST プルダウンアッセイなどにより、(1) マクロファージ細胞における TXS 遺伝子の major promoter は NF-E2/AP-1 site が規定しており、ここに相互作用する転写因子のひとつは NF-E2 related factor 2 (NRF2) であること、(2) 活性化された PPAR γ は蛋白-蛋白相互作用を介して NRF2 の DNA への結合を抑制することで、TXS 遺伝子プロモーターの転写活性を抑制していることが明らかとなった。

〈意義〉本研究で PPAR γ はマクロファージ細胞における TXS 遺伝子の発現を転写レベルで抑制すること、及びその機序が解明された。系統的实验と理論性に優れた論文であり、学位に値する。